

Rhizopus oryzae 의 酵素에 關한 研究

第1報, 酸性 Protease 生産 및 酵素의 特性

許 元 寧* · 鄭 萬 在

忠北大學校大學院農化學科*, 忠北大學校農科大學農化學科

(1979년 7월 6일수리)

Studies on the Enzyme of *Rhizopus oryzae*

Part I. Production of Acid Protease and Enzymatic Characteristics

Won-Nyong Hou*, Man-Jae Chung

Dept. of Agricultural Chemistry, Graduate school, Chung-Buk National University*

Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk National University-

Summary

These experiments were conducted to investigate the conditions of the acid protease production by *Rhizopus oryzae* and the characteristics of crude enzyme. The results obtained were as follows:

1. The optimum culture time and the optimum amount of added water to the wheat bran medium were about 48 hrs and 80~120%, respectively.
2. The addition of $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , casein, and albumin, respectively, as nitrogen sources to the wheat bran medium was effective. Of these, the optimum concentrations of addition of $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ and casein which were the most effective were 0.1% and 1.0%, respectively.
3. The addition of glucose, galactose, maltose, lactose, and soluble starch, respectively, as carbon sources to the wheat bran medium was effective. Of these, the optimum concentration of addition of glucose which was the most effective was 3.0%.
4. The addition of KH_2PO_4 as a phosphate salt to the wheat bran medium was effective. The optimum concentration of addition of KH_2PO_4 was 0.3%.
5. The optimum pH for the enzyme action was 2.4, the optimum temperature about 40°C, and the stable pH range 2.0~5.0. The enzyme was stable below 40°C.
6. The enzyme activity increased rapidly for 10 minutes after addition, but thereafter it increased slowly.
7. The enzyme activity increased rapidly to 2 ml of addition, but nearly did not increase at the amounts greater than 2ml.

머리말

微生物은 菌株에 따라 protease 의 生産能力이

다를뿐만 아니라 酵素의 特性도 多樣하며 또한 protease 의 生産量은 培養條件에 따라 甚하게 달라진다. 따라서 微生物 protease 의 生産에는 優

秀菌株의 選拔과 배양조건에 關한 多角의 研究가 要望된다.

微生物 protease는 醬油의 製造, 食肉의 軟化, 洗劑, 皮革加工 및 消化劑로서 그 用途가 多様하며 反應 pH에 따라 酸性protease, 中性protease, 및 알칼리性 protease로 分類한다.

絲狀菌의 酸性 protease에 關한 研究로는 *Asp. saitoi*⁽¹⁻⁶⁾, *Asp. oryzae*⁽⁷⁻⁹⁾, *Pen. expensum*^(10,11), *Pen. spinulosum*^(10,11), *Pen. purpurogenum*^(12,13), *Pen. vividicatum*⁽¹⁴⁾, *Pen. thomii*⁽¹⁴⁾, *Pen. frequentans*⁽¹⁴⁾, *Pen. oxalicum*⁽¹⁴⁾, *Rhiz. javanicus*^(10,11,15), *Rhiz. chinensis*^(10,11), *Rhiz. tritici*^(10,11), *Rhiz. chiuniang*^(10,11), *Rhiz. tonkinensis*⁽¹⁵⁾, *Rhiz. peka*⁽¹⁵⁾, *Rhiz. japonicus*⁽¹⁶⁾, *M. hiemalis*⁽¹⁰⁾, *M. racemosus*⁽¹⁰⁾, *M. pussillus*⁽¹⁷⁾, 등의 酸性 protease를 들수 있으며 主로 酵素의 特性에 關한 研究가 大部分을 차지하고 있다.

筆者는 *Rhiz. oryzae*가 耐酸性이 強한 酸性 protease를 生産함을 밝혀내고 酸性 protease 生産에 미치는 培地組成의 影響 및 粗酵素의 特性을 檢討한바 몇가지 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 菌株

Rhizopus oryzae(忠北大學校農化學科保管菌株)

2. 基本培地 및 培養方法

밀기울 5g에 수도물 5ml를 잘 混合하여 三角 후라스크에 넣고 1.5kg/cm²로 30分間加壓殺菌한 後 供試菌을 一白金耳 接種하여 30°C에서 培養하였다. 但 培養時間에 關한 實驗 以外는 培養時間을 48時間으로 하고, 添水量에 關한 實驗 以外는 밀기울에 對하여 添水量을 100%로 하였다.

3. 酵素液의 調製

各 培養후라스크에 100ml의 蒸溜水를 加하고 Homogenizer(Virtis)로 2分間 磨碎하여 酵素를 抽出하고, 10,000rpm에서 10分間 遠心分離한 後 上澄液을 粗酵素液으로 하였다.

4. Protease activity의 測定

Milk casein을 基質로 하는 Anson-荻原變法⁽¹⁸⁻²⁰⁾에 따라 測定하였다. 그리고 酵素單位는 1分間에 酵素液 1ml에 依하여 生成되는 tyrosine μ g數로서 表示하였다.

5. 酵素의 生産條件

培養時間에 따른 酵素活性의 變化를 보기 爲하

여 24時間부터 72時間까지 培養時間을 달리하여 培養하였으며, 培地의 最適 添水量을 알기 爲하여 60~160%까지 添水量을 달리하여 培養하였다. 또한 各種成分의 酵素生産에 미치는 影響을 보기 爲하여 數種의 無機窒素源(0.5%), 有機窒素源(1%), 炭素源(1%) 및 磷酸鹽(0.5%)을 基本培地에 添加하여 培養하였다.

6. 粗酵素의 特性

酵素作用에 對한 最適條件을 究明하기 爲하여 pH, 溫度, pH 安全性, 熱安全性, 作用時間 및 酵素液量의 影響을 檢討하였다.

實驗結果 및 考察

1. 酵素의 生産條件

1) 培養時間의 影響

培養時間別로 protease의 活性을 測定한 結果는 Fig. 1과 같이 約48時間 培養時에 最高의 活性을 나타내었으며, 그 以後에는 急激하게 減少되었다.

Ichishima 등⁽²¹⁾은 밀기울培地에서 62~64時間 培養이 *Asp. saitoi* acid protease의 生産에 가장 適當하고, 元永 등⁽²²⁾은 *Asp. oryzae*를 glucose와 peptone을 含有하는 培地에서 72時間 培養時에 最高의 活性을 나타내었다고 하였으며, 鄭 등⁽²³⁾은 *Mycrococcus sp.*를 밀기울培地에 144時間 培養하였을때 最高의 活性을 나타내나 그 以後에는 減少하였다고 하였다. 이와같이 最適培養時間은 菌株 및 培地의 種類에 따라 相當히 다른을 보여주고 있다.

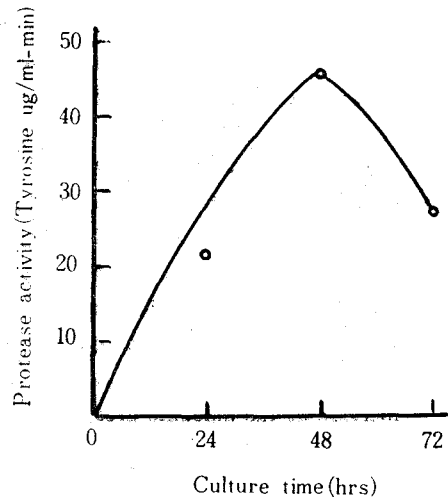


Fig.1. Effect of culture time on the protease production.

2) 培地添水量的 影響

固體培養에 依한 酵素生産은 培地의 水分含量에 따라 影響을 받게 되므로 밀기울 5g에 對하여 여러가지 比率로 水分을 添加하고 30°C에서 48時間 培養한 結果는 Fig. 2와 같이 80~120%의 添水가 效果의이었다.

Ichishima 등⁽²¹⁾은 밀기울培地에 50~70%의 添水가 *Asp. saitoi*의 acid protease生産에, 鄭 등⁽²²⁾은 117%의 添水가 *Myriococcum sp.*의 alkali protease生産에 效果的이라고 하였다. 이와같이 添水量은 菌株에 따라 相當히 差異가 있음을 보여주고 있다.

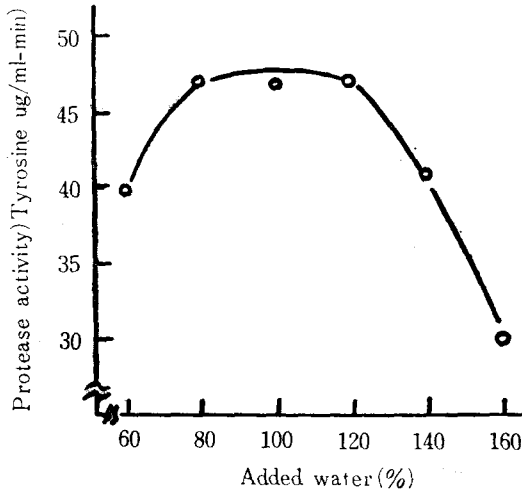


Fig. 2. Relationship between the rate of added water and protease production.

3) 無機窒素源 添加試驗

各種 無機窒素源을 밀기울培地에 各各 0.5%씩 添加하고 48時間 培養한 結果는 Table 1과 같이 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $(NH_4)_2SO_4$ 및 NH_4NO_3 의 添加는 效果的이었다.

Table 1. Effect of inorganic nitrogen sources on the protease production

Inorganic nitrogen sources (0.5%)	Relative protease activity (%)
KNO ₃	85.09
NaNO ₂	107.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	128.70
NH ₄ NO ₃	117.98
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	143.00
Control	100.00

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 의 添加量을 달리하고 培養한 結果는 Fig. 3와 같이 0.1% 添加時에 protease生産을 크게 增加시켰다.

Ichishima 등⁽²¹⁾은 *Asp. saitoi* acid protease生産에 NH₄-salt와 nitrate의 添加는 다른 窒素源의 添加보다 優秀하다고 하였으며, 그는 *Aspergillus*屬菌의 acid protease生産에 있어 無機窒素化合物의 添加效果에 따라 *Aspergillus*屬菌을 4가지 型으로 分類하였다. 本供試菌株는 Ichishima의 分類Ⅱ型처럼 NH₄-salt의 添加는 效果的이었으나 nitrate의 添加는 本菌株의 acid protease生産을 減少시켰다.

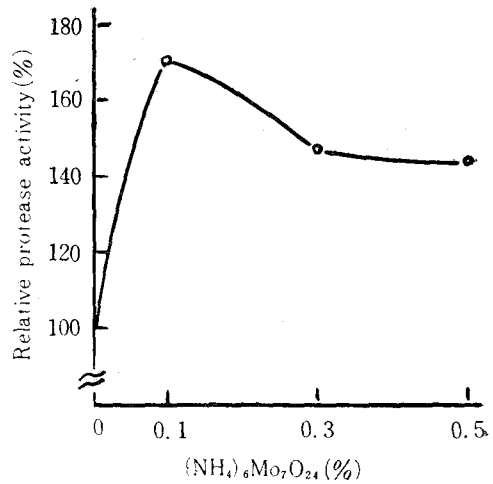


Fig. 3. Effect of concentration of $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ on the protease production

4) 有機窒素源 添加試驗

各種 有機窒素源을 밀기울培地에 各各 1%씩 添加하고 48時間 培養한 結果는 Table 2와 같이 casein과 albumin 添加時에 特히 效果的이었으며 casein의 添加量을 달리하여 培養한 結果는 Fig. 4와 같이 1%添加時에 最高의 活性을 나타내

Table 2. Effect of organic nitrogen sources on the protease production

Organic nitrogen sources (1%)	Relative protease activity (%)
Albumin	140.78
Peptone	77.72
Casein	187.02
Defatted milk powder	106.06
Control	100.00

었다.

protease의生産에 미치는有機窒素源의添加效果에關한研究는別로 찾아볼수 없으며, Ichishima 등⁽²¹⁾은 *Asp. saitoi* R-3812의 밀기울培養에 있어 NH_4 -tartrate, defatted soybean 및 NH_4 -citrate의添加가 效果的이었다고 하였다. 本菌株에 있어서 casein添加時 酵素의生産이 크게增加된 것은 本酵素가誘導酵素이기 때문인 것으로 생각된다.

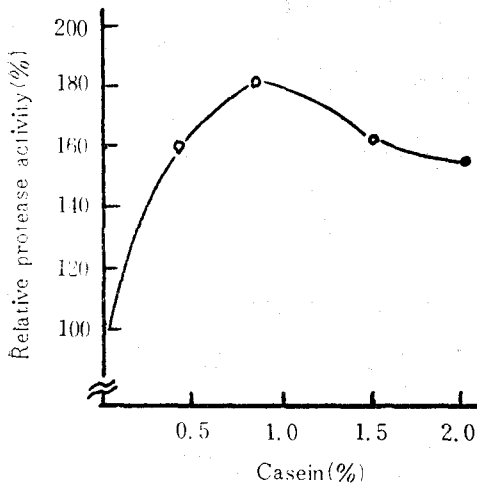


Fig. 4. Effect of concentration of casein on the protease production

5) 炭素源 添加試驗

各種 炭素源을 밀기울培地에 各各 1%씩 添加하고 48時間 培養한 結果는 Table 3과 같으며 glucose의 添加濃度를 달리하였을 때의 酵素生産에 미치는 影響은 Fig. 5와 같다.

Table 3. Effect of carbon sources on the protease production.

Carbon sources 1.0(%)	Relative protease activity (%)
Glucose	123.26
Fructose	107.32
Galactose	118.93
Mannose	105.42
Sucrose	108.82
Maltose	113.52
Lactose	117.90
Mannitol	108.74
Myoinositol	87.76
Soluble starch	121.52
Control	100.00

供試炭素源中 myoinositol만 除外하고 나머지 炭素源은 모두 protease의生産을 增加시켰으며, glucose 3% 添加時에 特히 效果的이었다.

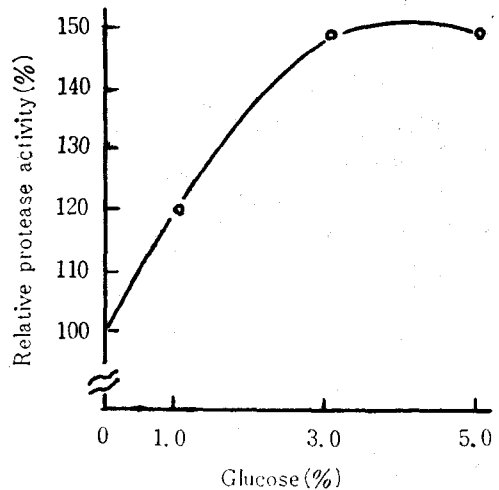


Fig. 5. Effect of concentration of glucose on the protease production

Ichishima 등⁽²¹⁾은 여러가지 炭素源의 添加는 *Asp. saitoi*의 acid protease 生産에 別效果가 없었다고 하였는데 本菌株의 境遇에 效果的인 影響을 보인것은 菌株의 差異때문인것으로 생각된다.

6) 磷酸鹽 添加試驗

各種 磷酸鹽을 밀기울培地에 各各 0.5%씩 添加하고 48時間 培養하였을 때 酵素의生産은 Table 4 및 Fig. 6와 같이 KH_2PO_4 가 效果的이었다으며, KH_2PO_4 의 最適添加濃度는 0.3%이었다.

Table 4. Effect of phosphate sources on the protease production

Phosphate sources (0.5%)	Relative protease activity (%)
KH_2PO_4	118.32
K_2HPO_4	88.39
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	100.12
Control	100.00

Ichishima 등⁽²¹⁾은 *Asp. saitoi*의 acid protease 生産에, 元永 등⁽²²⁾은 *Asp. oryzae* protease 生産에 KH_2PO_4 3% 添加는 效果的이었다고 報告하였는데 KH_2PO_4 의 添加濃度에 있어서 本菌株와는 相當한 差異를 나타내고 있다.

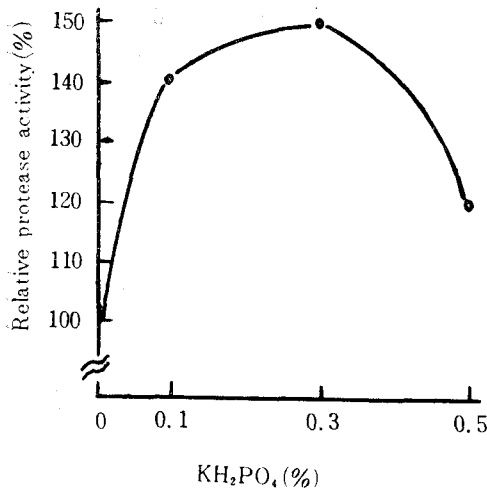


Fig. 6. Effect of Concentration of KH₂PO₄ on the Protease Production

2. 粗酵素의 特性

1) pH의 影響

McIlvaine buffer soln.을 사용하여 其質溶液의 pH를 所定 pH로 調節하고 protease 活性을 測定한 結果는 Table 5와 같이 opt. pH는 2.4로 本酵素는 acid protease에 屬한다.

Table 5. Effect of pH on the protease Activity

pH	Relative protease activity (%)
2.0	62.56
2.2	70.05
2.4	100.00
2.6	96.02
2.8	90.46
3.0	86.05

吉田⁽²⁾는 *Asp. saitoi* acid protease의 opt. pH는 milk casein, hemoglobin, soybean, α-protein, Ovalbumin을 基質로 할때 2.5~3.0이고, 蔭山⁽⁷⁾은 *Asp. oryzae* acid protease의 opt. pH는 2.8~3.0, 圓野⁽¹²⁾은 *Pen. purpurogenum*, *Pen. rubrum*의 acid protease는 opt. pH가 3.5이고 坂本⁽¹⁴⁾는 *Pen. vividicatum*, *Pen. thomii*, *Pen. frequentans*, *Pen. oxalicum*의 protease는 pH 3.0에서 casein에 가장 잘 作用한다고 하였고, *Rhiz. javanicus*, *Rhiz. peka*, *Rhiz. chine-*

nsis 등의 acid protease⁽¹⁰⁾는 opt. pH가 3.0附近이라고 하였는데 本菌株가 生産하는 protease도 이들 protease와 마찬가지로 acid protease에 屬한다.

2) 熱安全性

酵素液에 同量의 McIlvaine buffer soln. (pH 2.4)을 넣고 所定溫度에서 10分間 維持시킨 後 殘存活性을 測定한 結果는 Table 6에서 보는 바와 같이 40°C 以下에서는 安定性을 보였으나 그 以上의 溫度에서는 不安定하여 50°C에서는 約 10%, 60°C에서는 約 96%가 失活되었다.

Table 6. Thermal stability of protease

Temp. (°C)	Relative protease activity (%)
20	99.06
30	99.65
40	100.00
50	90.05
60	3.65

*Rhiz. chinensis*의 acid protease⁽²⁴⁾는 60°C 以下의 溫度로 15分間 維持하였을 때 安全하며 65°C의 境遇 20%가 失活되었고, *Pen. purpurogenum*과 *Pen. rubrum*의 acid protease⁽⁹⁾는 pH 5.0에서 60°C로 10分間 處理할때 殘存活性은 90%이었으며, 布川⁽⁹⁾은 Rice Koji의 acid protease와 alkaline protease는 60°C에서 10分間 處理로 完全히 失活되었다고 하였다. 이와같이 菌株에 따라 熱安全性이 各各 다른데 本菌株가 生産하는 acid protease는 熱에 對하여 매우 不安定하였다.

3) 溫度의 影響

20~60°C의 範圍에서 酵素活性을 測定한 結果는 Table 7과 같이 最適反應溫度는 40°C 附近이었다.

Table 7. Effect of temp. on the protease activity

Temp. (°C)	Relative protease activity (%)
20	70.02
30	81.45
40	100.00
50	60.25
60	8.55

Bergkvist⁽²⁵⁾는 *Asp. oryzae* acid protease의 opt. temp.는 45°C, *Rhiz. chinensis* acid protease⁽²⁴⁾의 opt. temp.는 60°C, *Pen. purpurogenum*과 *Pen. rubrum*의 acid protease⁽¹³⁾는 50~55°C, *Monascus sp.*의 alkali性 protease⁽²⁵⁾는 50°C, *Strep. griseus* protease⁽²⁷⁾는 60~80°C, *Myriococcum sp.*의 alkali性 protease⁽²³⁾는 50~55°C 라고 하였다.

이와같이 菌株에 따라 作用最適溫度가 各各 다르며 本菌株가 生産하는 acid protease는 比較的 낮은 溫度를 適溫으로 하고 있다.

4) pH 安全性

酵素液 1ml에 所定 pH의 buffer soln.(Clark-Lubs buffer soln., McIlvaine buffer soln.) 1ml를 混合하여 5°C에서 24時間 放置한 後 pH 2.4가 되도록 調節하고 殘存活性을 測定한 結果는 Table 8과 같이 pH2~5에서 安定하였으며 그 以上에서는 急激하게 減少하여 pH 8에서는 거의 活性이 나타나지 않았다.

*Asp. saitoi*의 acid protease⁽⁴⁾는 pH 2.5~6.0에서, *Asp. oryzae*의 acid protease⁽²⁵⁾는 2.5~6.0에서, *Rhiz. chinensis*의 acid protease⁽²⁴⁾는 2.8~6.5, *Pen. purpurogenum*과 *Pen. rubrum*의 acid protease⁽¹³⁾는 2~7, *Monascus sp.*의 alkali protease⁽²⁶⁾는 5~12의 範圍에서 安定性을 보였다고 하였다.

Table 8. pH Stability of protease

pH	Relative protease activity (%)
1.0	70.25
2.0	99.65
3.0	99.40
4.0	100.00
5.0	99.02
6.0	70.36
7.0	22.55
8.0	5.05

이들 報告와 比較하면 本菌株의 acid protease는 다른 菌株의 acid protease의 安定性과 類似하나 그 範圍가 약간 狹少한 便에 屬한다.

5) 酵素의 作用時間 및 酵素液量의 影響

最適溫度인 40°C에서 10~60分間 反應시켜 酵素의 活性을 測定한 結果는 Table 9와 같이 10分까지는 急激한 增加를 보였으나 그 以後에는 緩

慢한 增加를 보였다.

Table 9. Effect of reaction time on the protease activity

Reaction time (min.)	Relative protease activity (%)
10	51.46
20	68.58
30	79.05
40	83.45
50	90.22
60	100.00

酵素液의 量을 1~5ml까지 달리하여 活性을 測定한 結果는 Table 10과 같이 酵素液 2ml까지는 酵素活性이 急激하게 增加하였으며 그 以上에서는 變化가 거의 없었다.

Table 10. Effect of enzyme amount on the protease activity

Enzyme amount (ml)	Relative protease activity (%)
1	62.25
2	99.06
3	99.45
4	99.42
5	100.00

要 約

酸性 protease를 生産하는 *Rhiz. oryzae*의 酵素生産條件과 粗酵素의 特性을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 밀기울 培地에서의 最適 培養時間은 約 48時間, 最適 添水量은 80~120%이었다.

2) 밀기울 培地에 窒素源으로서 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 , casein, albumin의 添加는 各各 效果的이었으며 가장 優秀한 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 와 casein의 最適添加濃度는 各各 0.1%, 1.0%이었다.

3) 밀기울 培地에 炭素源으로서 glucose, galactose, maltose, lactose, soluble starch의 添加는 效果的이었으며 가장 優秀한 glucose의 最適添加濃度는 3%이었다.

4) 밀기울 培地에 磷酸鹽으로서 KH_2PO_4 의 添加는 效果的이었고 最適添加濃度는 0.3%이었다.

5) 本酵素의 作用最適 pH는 2.4, 最適溫度는

40°C 附近, 安定 pH 範圍는 2.0~5.0 이고, 40°C 以下에서 安定하였다.

6) 酵素活性은 10分까지는 急激하게 增加하지만 그 以後에는 緩慢하게 增加하였다.

7) 酵素液 2ml 까지는 酵素活性이 急激하게 增加하였으나 그 以上에서는 거의 變化가 없었다.

參考文獻

1. 一島英治, 吉田文彦: 生化學, **35**, 534(1963)
2. 吉田文彦: 日農化, **29**, 175(1955)
3. Yoshida, F.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **20**, 252(1956)
4. Yoshida, F. and Nagasawa, M.: Agr. Chem. Soc. Japan, **22**, 32(1957)
5. Yoshida, F. and Nagasawa, M.: *ibid.*, **20**, 257(1956)
6. Yoshida, F. and Nagasawa, M.: *ibid.*, **20**, 262(1956)
7. 蔭山公雄: 醸工誌, **33**, 53(1955)
8. 松島欽一: 醸工誌, **36**, 414(1959)
9. 布川彌太郎, 難波康之祐, 廣山陽三: 日農化, **36**, 879(1962)
10. 松島欽一: 日農化, **32**, 215(1958)
11. 松島欽一: 日農化, **33**, 116(1959)
12. 團野源一, 吉村文彦: 農化學大會要旨, p.11 (1963)
13. 吉村貞彦, 岸田忠昭, 團野源一: 日農化, **38**, 128(1964)
14. 阪本正義: 醸工誌, **35**, 386, 431(1957)
15. 阪本正義: 醸工誌, **35**, 238, 278(1957)
16. 鄭萬在: 韓國食品科學會誌, **9**, 31(1977)
17. 有馬啓, 岩崎慎二郎: 農化學大會要旨, p.51 (1962)
18. Anson, M.L.: J. Gen. Physiol, **22**, 79(1938)
19. 萩原文二: 標準生化學實, 207(1953)
20. Hakiyara, B., Matsubara, H., Nakai, H. and Okunuki, K.: J. Biochem., **45**, 185(1958)
21. Ichishima, E. and Yoshida, F.: Agr. Biol. Chem. Japan, **26**, 547(1962)
22. 元永和生, 三浦勇吉: 日農化, **32**, 422(1957)
23. 鄭東孝, 李啓瑚: 한국농화, **13**, 223(1970)
24. Fukumoto, J., Tsuru, D. and Yamamoto, T.: Agr. Biol. Chem., **31**, 710(1967)
25. Bergkvist, R.: Acta. Chem. Scand., **17**, 6 (1963)
26. 金相達, 徐正填: 한국농화, **15**, 1(1972)
27. 藤田重男: 食品工業, **3**, 406(1960)